

УДК 579: 577.11 : 612. 112.94

## ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА *SHIGELLA IN VITRO*

**А.В. ЯНЧЕВСКИЙ<sup>1</sup>, И.С. ГАЙДАШ<sup>1</sup>, В.В. ДЫЧКО<sup>2</sup>, С.Т. КОХАН<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Луганский государственный медицинский университет,

г. Луганск, Украина

<sup>2</sup>Донбасский государственный педагогический университет,

г. Славянск, Украина

<sup>3</sup>Забойкальский государственный университет,

г. Чита, Российская Федерация

**Введение.** Недостаточность Т–системы иммунитета является основным фактором развития иммунодефицитного состояния [1, 9]. Подавляющее большинство инфекционных процессов бактериальной этиологии протекает на фоне формирования супрессорного варианта иммунодефицита [4, 10]. Основной причиной данного состояния является интоксикация, обусловленная действием бактериальных токсинов, в том числе и липополисахаридов (ЛПС) – структурных компонентов всех грамотрицательных бактерий [9].

В последние годы активно изучается влияние разных субстанций бактериальной природы на функциональную, метаболическую активность иммунокомпетентных клеток [6, 8]. Особое место в этом исследовании занимает аспект апоптоза иммуноцитов под влиянием бактериальных компонентов. Установлено апоптогенное воздействие на лимфоциты крови человека пептидогликанов, тейхоевых кислот, экзотоксинов и ЛПС отдельных представителей родов *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* [2, 3, 7]. Влияние липополисахаридов (ЛПС) бактерий рода *Shigella* на апоптоз Т–лимфоцитов крови человека ранее не изучалось.

Целью настоящего исследования явилось определение воздействия ЛПС бактерий рода *Shigella* на апоптоз Т–лимфоцитов крови человека *in vitro*.

**Методика и объекты исследования.** Показатели апоптоза изучались на культурах нейтрофилов и моноцитов, выделенных из крови 37 практически здоровых доноров 19–24 лет (средний возраст – 22,5±1,2 года). Работу выполняли с соблюдением всех положений биоэтики (Страсбург, 1985 год).

Лимфоциты выделяли градиенте плотности фиколла–верографина ( $\rho=1,076$ ) по модифицированной методике Воуит [5]. Сепарацию Т–лимфоцитов от популяций НК–лимфоцитов и В–лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов осуществляли с помощью моноклональных антител CD14, CD16 и CD22 (производства НППЦ «Медбиоспектр», Москва, РФ). Для этого в суспензию лимфоцитов вносили указанные антитела в разведении 0,1–0,2 мкг/мл в количестве 0,025 мл с последующим через 40 минут добавлением комплемента морской свинки, разведенного изотоническим раствором натрия хлорида в соотношении 1:1. Смесь инкубировали 60 мин в термостате, после чего Т–лимфоциты трижды отмывали при центрифугировании в среде 199. Сепарацию Т–лимфоцитов на субпопуляции Т–хелперов/индукторов и Т–супрессоров/цитотоксиков осуществляли при помощи моноклональных антител CD4 и CD8 по аналогичной методике. Рабочая концентрация суспензий Т–лимфоцитов составляла  $2 \cdot 10^9$  л/л.

Препараты ЛПС получали водно–феноловой экстракцией из культур *Shigella flexneri* (1a, 1b) *Shigella sonnei* [11]. Очистку препаратов проводили обработкой 50 нг/мл РНКазы (фирмы Sigma) и 16 нг/мл ДНКазы (фирмы Sigma) с последующим диализом через 50 М трис–буфер и центрифугированием при 20000 G в течение 30 мин. Осадок сушили лиофильно. Для восстановления активности ЛПС использовали редокс–обработку. Растворы ЛПС обрабатывали 2–меркаптоэтанолом с конечной концентрацией 0,1 М в течение 18 ч при +4°C. Раствор хранили при –20°C. Перед использованием раствор обрабатывали ультразвуком на водяной бане в течение 5 мин. Использовали следующие рабочие концентрации ЛПС (мкг/мл): 10 и 100.

Изучение потенциальной апоптогенной активности ЛПС в отношении нейтрофилов и моноцитов проводили морфологическим методом. Для морфологической оценки апоптоза взвесь клеток (нейтрофилов или моноцитов) наносили на предметное стекло, подсушивали и окрашивали акридин–оранжевым следующим образом. Раствор акридин–оранжевого в дистиллированной воде (0,1

% разводили перед использованием в 10 % фосфатным буфером до pH=6,0–6,5 добавлением 0,1 М раствора  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Предметное стекло покрывали красящим раствором на 15 мин., далее удаляли его фильтровальной бумагой и промывали свежей порцией закисленного фосфатного буфера. Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа с синим светофильтром. Рассчитывали индекс апоптоза (ИА) как количество апоптозных клеток на 100 нейтрофилов или моноцитов в образце (значение выражали в %).

Экспонирование рецепторов к моноклональным антителам CD95 на цитоплазматических мембранах нейтрофилов и моноцитов изучали методом непрямой иммунной флуоресценции с использованием моноклональных антител производства научно–производственного центра «Медбиоспектр» (Москва, Российская Федерация).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием критерия Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Апоптогенное действие ЛПС бактерий рода *Shigella* выражалось в увеличении количества апоптирующих клеток, а также в увеличении количества клеток, экспонирующих специфические маркеры апоптоза – CD95, что в последнем случае свидетельствовало о готовности таких клеток к реализации апоптозной программы. С увеличением действующих концентраций шигеллёзных ЛПС, а также с увеличением продолжительности их контакта с клетками–мишенями происходило значительное усиление апоптогенного воздействия. Наибольший уровень апоптирующих клеток регистрировался при концентрациях ЛПС 100 мкг/мл и экспозиции 24 ч (таблицы 1 и 2).

Таблица 1– Влияние липополисахаридов на апоптоз CD4+–лимфоцитов человека in – vitro

Время, ч	Интактные клетки (n=37)	ЛПС <i>Shigella flexneri</i> <i>Ia</i> , мкг/мл		ЛПС <i>Shigella flexneri</i> <i>Ib</i> , мкг/мл		ЛПС <i>Shigella sonnei</i> , мкг/мл	
		10 (n=15)	100 (n=17)	10 (n=16)	100 (n=19)	10 (n=15)	100 (n=17)
ИА (%)							
0	4,4±0,23	4,3±0,18	4,5±0,21	4,2±0,2 3	4,4±0,20	4,4±0,19	4,3±0,19
6	7,0±0,35	8,3±0,3 *	13,4±0,6 ***	8,5±0,5 ***	14,3±1,1* **	8,2±0,5 ***	14,7±1,4***
24	16,8±0,82	21,9±1,3*	38,8±1,9 ***	23,0±1,5***	41,6±2,4* **	22,5±1,6 ***	37,9±2,5***
Экспрессия CD95–рецепторов (%)							
0	4,0±0,20	4,2±0,20	4,4±0,25	4,1±0,2 1	4,3±0,25	4,3±0,25	4,5±0,26
6	6,5±0,33	9,5±0,52***	17,9±0,81* **	10,2±0,8***	19,2±1,3* **	9,8±1,15 ***	18,7±1,5***
24	11,7±0,59	26,5±2,0***	50,5±2,6** *	28,1±2,4***	54,0±3,0* **	25,9±2,3 ***	49,6±2,8***

Примечание –\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 по сравнению с показателем интактных клеток.

Таблица 2 – Влияние липополисахаридов на апоптоз CD8<sup>+</sup>–лимфоцитов человека in-vitro

Время, ч	Интактные клетки (n=33)	ЛПС <i>Shigella flexneri</i> <i>1a</i> , мкг/мл		ЛПС <i>Shigella flexneri</i> <i>1b</i> , мкг/мл		ЛПС <i>Shigella sonnei</i> , мкг/мл	
		10 (n=14)	100 (n=13)	10 (n=16)	100 (n=14)	10 (n=13)	100 (n=15)
ИА (%)							
0	2,7±0,12	2,9±0,13	2,7±0,12	2,6±0,14	2,8±0,13	2,9±0,13	2,6±0,14
6	3,8±0,17	4,4±0,3	9,3±0,2*	4,3±0,21	9,7±0,6*	4,4±0,2	9,5±0,3*
24	6,9±0,31	11,2±0,4 ***	23,6±0,4 ***	10,8±0,4 ***	22,3±1,0 ***	10,2±0,4 ***	22,6±0,6* **
Экспрессия CD95–рецепторов (%)							
0	1,9±0,1	2,0±0,1	1,8±0,1	1,9±0,1	2,0±0,1	1,9±0,1	2,1±0,1
6	3,1±0,16	3,7±0,18*	13,7±0,2 ***	3,7±0,19 *	14,4±0,2* **	3,8±0,2 *	14,3±0,2 ***
24	5,8±0,30	16,6±0,8 ***	32,7±0,9 ***	17,3±0,9 ***	33,5±1,0 ***	17,7±0,9 ***	39,1±1,0 ***

Примечание – \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 по сравнению с показателем интактных клеток.

Как следует из приведенных данных, воздействие шигеллёзных ЛПС в дозе 10 мкг/мл вызывало в субпопуляции CD4<sup>+</sup>–лимфоцитов, идентифицируемых как Т–хелперы/индукторы, увеличение ИА на 6–м часу эксперимента в 1,19–1,28 раза (p<0,05), а на 24–м часу – увеличение в 1,30–1,37 раза (p<0,001), по сравнению с интактными клетками. В присутствии ЛПС в концентрации 100 мкг/мл подобные степени увеличения ИА для CD4<sup>+</sup>–лимфоцитов составили 1,91–2,1 и 2,26–2,48 раза, соответственно (p<0,01).

В тоже время, степень увеличения ИА для субпопуляции CD8<sup>+</sup>–лимфоцитов на 6–м часу взаимодействия с шигеллёзными ЛПС в дозе 10 мкг/мл составила 1,13–1,16 раза, а на 24–м часу – 1,48–1,62 раза, в зависимости от разновидности использованных ЛПС. Увеличение действующей концентрации ЛПС до 100 мкг/мл вызывало в CD8<sup>+</sup>–лимфоцитах повышение ИА на 6–м часу взаимодействия в 2,4–2,6 раза, а на 24–м часу – в 3,2–3,4 раза. То есть, субпопуляция CD8<sup>+</sup>–лимфоцитов к действию на них шигеллёзных ЛПС была более чувствительной, чем субпопуляция CD4<sup>+</sup>–лимфоцитов.

Динамика изменения экспрессии маркера апоптоза CD95 на лимфоцитах под влиянием шигеллёзных ЛПС была следующей.

Под влиянием ЛПС в действующей концентрации 10 мкг/мл степень увеличения CD95<sup>+</sup>–хелперов/индукторов, против интактных клеток, на 6–м часу опыта составила 1,46–1,57 раза, а на 24–м часу – 2,21–2,40 раза. Для субпопуляции CD8<sup>+</sup>–лимфоцитов подобные кратности оказались равны 1,19–1,22 и 2,9–3,05 раза, соответственно. При использовании шигеллёзных ЛПС в дозе 100 мкг/мл кратность увеличения уровня CD95<sup>+</sup>–хелперов/индукторов колебалась на 6–м часу эксперимента от 2,80–2,95 раза, а на 24–м часу – от 4,24 до 4,60 раза. В субпопуляции CD8<sup>+</sup>–лимфоцитов аналогичные изменения составили 4,42–4,65 и 5,64–6,74 раза, соответственно. То есть, как и в случае с ИА, субпопуляция CD8<sup>+</sup>–лимфоцитов к действию на них шигеллёзных ЛПС оказалась более чувствительной, чем субпопуляция CD4<sup>+</sup>–лимфоцитов. Этот феномен объясняет особенности патогенеза шигеллёзов, при которых наряду с развитием относительного супрессорного варианта вторичного иммунодефицита имеют место и аллергические реакции, выявляемые в кожных пробах с дизентеринном.

Следует также отметить, что видоспецифическое и серовариантно–специфическое влияние шигеллёзных ЛПС на апоптоз субпопуляций Т–лимфоцитов выявлено не было. При равных условиях эксперимента все тестируемые разновидности ЛПС оказывали сходное, статистически недостоверное между собой влияние на изучаемые показатели апоптоза.

**Выводы.** ЛПС бактерий рода *Shigella* в действующих концентрациях 10 и 100 мкг/мл и при экспозиции до 24 ч in vitro стимулируют апоптоз Т–хелперов/индукторов и цитотоксических Т–супрессоров, что проявляется увеличением количества клеток с морфологическими признаками апоптоза, а также количества клеток с маркером апоптоза CD95. Апоптозстимулирующее действие шигеллёзных ЛПС является видонеспецифическим, дозо– и времязависимым. Наиболее чувствительны к апоптогенному действию шигеллёзных ЛПС являются Т–супрессоры/цитотоксики.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Апоптоз нейтрофилов как параметр воспалительной реакции при патологии различного генеза / А.В. Пасечник, В.А. Фролов, Н.Г. Гвоздь [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. – 2004. – № 1. – С. 103 – 105.
2. Русалов, В.Л. Влияние пептидогликанов, тейхоевых кислот и липополисахаридов бактерий на метаболическую активность и апоптоз нейтрофилов и субпопуляций Т-лимфоцитов *in vitro*: дис. ... кандидата мед. наук: 14.03.04 / Русалов Виталий Леонидович. – Луганск, 2009. – 142 с.
3. Русалов, В.Л. Влияние структурных компонентов бактерий на апоптоз и метаболизм нейтрофилов и субпопуляций Т-лимфоцитов / В.Л. Русалов // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2008. – Т. 3, № 5. – С. 34 – 36.
4. Рябиченко, Е.В. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных липополисахаридов / Е.В. Рябиченко, Л.Г. Веткова, В.М. Бондаренко // Журнал микробиологии. – 2004. – № 3. – С. 98 – 105.
5. Хейфец, Л.Б. Разделение форменных элементов крови человека в градиенте плотности верографин-фиколл / Л.Б. Хейфец, В.А. Абалакина // Лабораторное дело. – 1973. – № 10. – С. 579 – 581.
6. Evaluation of apoptotic activity of new condensed pyrazole derivatives / E. Tonon, E Ignatowicz, M.K. Bernard [et al.] // Journal of Physiology and Pharmacology. – 2013. – № 1. – P. 350 – 368.
7. Fas/FasL pathway-mediated alveolar macrophage apoptosis involved in human silicosis / S. Yao, L.W. Rojanasakul, Z. Chen [et al.] // Apoptosis. – 2011. – № 16(12) – P. 1195 – 1204.
8. Flegontova, V.V. Morphological signs of apoptosis induced by bacteria – causative agents of inflammatory infections / V.V. Flegontova, I.S. Gaidash, N.K. Kasimirko [et al.] // Annals of Anatomy. – 2002. – № 184 (Supplment). – S. 210 – 211.
9. In vivo apoptosis in *Shigella flexneri* infection / A. Zychlinsky, K. Thirumalai, J. Arondel [et al.] // Apoptosis. – 2010. – № 15(9). – P. 1098 – 1113.
10. In vivo versus in vitro protein abundance analysis of *Shigella dysenteriae* type 1 reveals changes in the expression of proteins involved in virulence, stress and energy metabolism [Электронный ресурс]. S. Kuntumalla, Q. Zhang, J.C. Braisted, R.D. Fleischmann [et al.] // BioMed Central Microbiology. – 2011. – № 11. – P. 147. – Режим доступа к журн. : <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/147>.
11. Westphal, O. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol–water and further application of the procedure / O. Westphal, K. Jann // Methods of Carbohydrate Chemistry. – 1965. – № 5. – P. 83 – 91.

## INDICES OF APOPTOSIS OF HUMAN BLOOD SUBPOPULATIONS OF LYMPHOCYTES BEEN UNDER THE INFLUENCE OF BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDES OF GENUS SHIGELLA IN VITRO

*A.V. YANCHEVSKY, I.S. GAIDASH, V.V. DICHKO, S.T. KOKHAN*

### *Summary*

Article is devoted to the study in vitro of apoptosis of human blood T-lymphocytes been under the influence of lipopolysaccharides of bacteria genus *Shigella*.

**Key words:** T-lymphocytes, apoptosis, lipopolisaccharide, shigella.

© Янчевский А.В., Гайдаш И.С., Дычко В.В., Кохан С.Т.

*Поступила в редакцию 7 октября 2013г.*